

# 高效凝胶渗透色谱法测定多糖纯度及分子量

魏远安 方积年

(中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

**提要** 用已知平均分子量 ( $\bar{M}_w$ ) 的 T 系列葡聚糖为标准, 分别用两种不同的流动相, 在 Bio-Gel TSK 柱上测定多糖的纯度及分子量。用线性回归法得出校正曲线。分子量  $\bar{M}_w$  的平均偏差不得超过 5%。

**关键词** 高效凝胶渗透色谱; 多糖; 分子量

近二十年来发现多糖具有复杂的多方面的生物活性和功能, 已引起国内外学者的重视<sup>(1)</sup>。对于多糖的研究, 首要问题是纯度和分子量的测定。过去常用的测定方法有超离心法、高压电泳法、渗透压法、粘度法和光散射法等<sup>(2)</sup>, 这些方法比较麻烦且误差很大。七十年代以后, 由于耐压合成凝胶的出现, 可以应用高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 测定多糖的纯度和分子量, 它具有快速、高分辨和重现性好的优点。在国外, 这一方法已得到越来越多的应用。如控制医用葡聚糖的质量<sup>(3)</sup> 以及直链与支链淀粉的测定<sup>(4)</sup>。在国内, 除我们报道的论文<sup>(5)</sup> 有简单述及外, 还未见其它详细报道。本文着重研究以两种不同流动相, 用 TSK 柱测定多糖的纯度与分子量, 并对这一方法引起的误差进行探讨。

## 实验部分

### 一. 仪器和药品

Bio-Rad 高效液相色谱仪 (Model 1330HPLC 泵)。Shodex RI SE-51 型示差折光检测器。柱为 Bio-Gel TSK-40 和 TSK-50, 二不锈钢柱串联使用, 每根柱为  $300 \times 7.5$  mm, 日本制造。LKB2210 记录仪。标准多糖为 T 系列葡聚糖 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), T-2000 ( $\bar{M}_w > 2,000,000$ ), T-500 ( $\bar{M}_w 450,000$ ), T-110 ( $\bar{M}_w 110,000$ ), T-70 ( $\bar{M}_w 68,500$ ), T-40 ( $\bar{M}_w 44,000$ ), T-20 ( $\bar{M}_w 21,600$ )。葡萄糖 (分析纯), 水为重蒸馏水。PIB-I, PIB-II-A, PIB-II-B, PIA-I 和 BJ-III 为未知分子量之多糖样品。

### 二. 高效凝胶渗透色谱法的条件

流动相 A: 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH6.0); 流动相 B: 0.1 mol/L Tris-盐酸缓冲液 (pH8.0) (均用水泵经 G-5 玻璃漏斗抽滤, 同时脱气)。样品溶于缓冲液, 制成

0.2% (w/v) 浓度, 离心 3 min (16,000 r/min), 上清液每次进样 20 μl。流速: 0.5 ml/min; 纸速: 1 mm/min; 温度 23~25℃。在上述条件下, 标准品与样品多糖色谱图见图 1, 2。

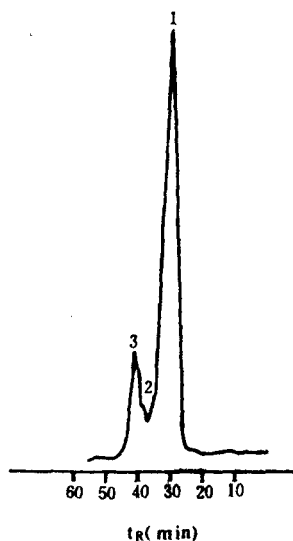


Fig 1. Chromatogram of the sample BJ-III. 1. BJ-III; 2 and 3. Impurity. Temperature: 24℃; mobile phase: 0.2 mol/L phosphate buffer (pH 6.0).

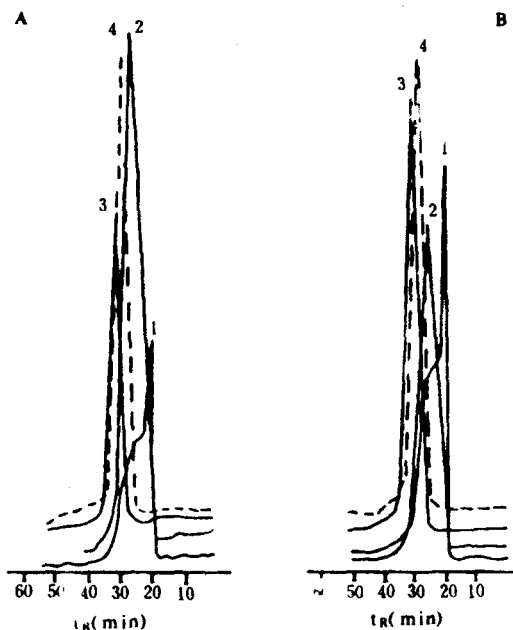


Fig 2. Chromatograms of T-dextran series and the sample (PIB-II-A). 1. T-2000; 2. T-500; 3. T-40; 4. PIB-II-A. Temperature: 23~25℃; mobile phase: A. 0.2 mol/L phosphate buffer, pH 6.0; B. 0.1 mol/L tris-HCl buffer, pH 8.0.

### 三. 方法和结果

用 HPGPC 测定多糖的分子量, 其原理和方法与常压 GPC 一样, 结果也相同。Dreher 等<sup>(6)</sup> 通过实验数据证实了以上结论。在大量实验工作的基础上, 发现多糖的分子量与其在凝胶柱上的洗脱体积  $V_e$ 、分配系数  $K_{av}$  存在如下关系<sup>(3, 4, 6-8)</sup>:

$$V_e = a - b \ln M \quad (1)$$

$$K_{av} = k_1 - k_2 \ln M \quad (2)$$

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

其中  $a, b, k_1, k_2$  为常数,  $V_e$  为洗脱体积;  $V_0$  为柱的空体积;  $V_t$  为柱的总体积。

本文以 T-2000 葡聚糖和葡萄糖分别测定所用 TSK 柱的  $V_0$  和  $V_t$ , 以 T 系列葡聚糖标准品测定不同分子量葡聚糖的  $V_e$  及  $K_{av}$ , 在两种不同流动相中测定结果见表 1。

以  $K_{av}$  对  $\ln M_w$  进行线性回归处理。由于 T-2000 和葡萄糖的分子量已超出所用柱子的分离范围, 故不参加线性回归, 只用作决定  $V_0$  和  $V_t$ , 进而求出各  $K_{av}$  值。回归后得如表 2 所示的线性关系。

Tab 1.  $t_R$  and  $K_{av}$  of T-dextran series

Eluent	Phosphate buffer		Tris-HCl buffer	
	$t_R$ (min)	$K_{av}$	$t_R$ (min)	$K_{av}$
T-2000	20.5	0.000	20.8	0.000
T-500	27.0	0.344	26.0	0.284
T-110	28.9	0.444	28.0	0.393
T-70	30.0	0.503	29.9	0.497
T-40	31.9	0.603	31.0	0.557
T-20	32.9	0.656	32.8	0.656
Glucose	39.4	1.000	39.1	1.000

Tab 2. Relationship between  $M_w$  and  $K_{av}$ 

Mobile phase	Linear regression	Regression coefficient
Phosphate buffer	$K_{av} = 1.72 - 0.107 \ln M_w$	0.977
Tris-HCl buffer	$K_{av} = 1.88 - 0.125 \ln M_w$	0.983

从而求得各样品的分子量。表 3 为各样品的  $t_R$ ,  $K_{av}$  及  $M_w$  值。

Tab 3.  $t_R$ ,  $K_{av}$  and  $M_w$  of samples

Sample	PIB-I	PIB-II-A	PIB-II-B	PIA-I
$t_R$ (min) A	31.5	30.0	32.0	33.5
	B	31.0	29.5	31.5
$K_{av}$ A	0.582	0.503	0.608	0.688
	B	0.557	0.475	0.585
$M_w(\times 10^4)$ A	4.06	8.51	3.19	1.51
	B	4.21	8.13	3.36
Average $M_w(\times 10^4)$	4.14	8.32	3.28	1.59
Average deviation(%)	1.8	2.3	2.6	5.0

A. Phosphate buffer; B. Tris-HCl buffer.

## 讨 论

一. 色谱图 1 中示出的 BJ-III 多糖样品, 曾用高压电泳法和超离心法测定, 认为已经提纯, 但在 HPGPC 图谱中仍可明显地看出其间含有小分子杂质。这表明了 HPGPC 法在测定纯度上比其它方法更准确。图 2 给出了在两种不同流动相中部分标准品和样品的色谱图。从图中可以看出 T-2000 葡聚糖标准品的分子量分布较宽, 在测定  $V_0$  时, 以其最大分子量的尖峰为准。

二. 从色谱图及实验结果看, HPGPC 法作为快速测定多糖分子量及分子量的分布之

手段, 其结果和重现性是令人满意的。事实上, 凝胶渗透色谱中的分子筛作用使得溶质分子按分子的大小 (Stores 半径  $r_s$  的大小) 顺序洗脱, 而并非直接以溶质的分子量大小顺序洗脱。与许多柔韧可变的大分子一样, 葡聚糖的  $K_{av}$  与其分子量的对数成线性关系, 而不是理论上按球状分子推出的  $(-\ln K_{av})^{1/2}$  与  $M^{1/3}$  成正比例, 所以, 上述的 (1) 和 (2) 式皆为经验公式<sup>(9)</sup>。正因为葡聚糖 (及许多其它多糖) 的柔韧可变性, 所以在不同的溶剂中其伸展、皱缩的程度也不一样, 这必然会影响到它在 GPC 柱中的迁移行为。直观的反映在同一样品的  $V_e$  和  $K_{av}$  在不同流动相中有所不同。由此可以说明我们在不同流动相中测出的样品分子量有 5% 左右的平均偏差应该是合理的, 结果是可信的。

三. 在 HPGPC 方法中还有其它一些引起误差的因素。例如标准品与样品多糖结构之间的差异、凝胶柱对多糖等大分子可能产生的吸附作用、大分子在柱上的扩散, 多糖的浓度、粘度、测试的温度等。值得一提的是  $K_{av}$  的引入就是为了尽可能的减少各自实验条件因素产生的影响<sup>(7)</sup>。

### 参 考 文 献

1. 方积年. 多糖研究的现状. 药学报 1986; 21: 944.
2. 方积年. 多糖的分离纯化及其纯度鉴别与分子量测定. 药学通报 1984; 19: 46.
3. Alosp RM, et al. Determination of the molecular weight of clinical dextran by gel permeation chromatography on TSK PW type columns. *J Chromatogr* 1982; 246: 227.
4. Kobayashi S, et al. Rapid analysis of starch, amylose and amylopectin by high-performance size-exclusion chromatography. *Ibid* 1985; 319: 205.
5. Fang JN, et al. Immunologically active polysaccharides of *Acanthopanax senticosus*. *Phytochemistry* 1985; 24: 2619.
6. Dreher TW, et al. Comparison of open-column and high-performance gel permeation chromatography in the separation and molecular-weight estimation of polysaccharides. *J Chromatogr* 1979; 174: 443.
7. Kirsti AG, et al. Molecular weight distribution analysis by gel chromatography on sephadex. *Ibid* 1967; 28: 69.
8. Goran N, et al. Molecular-weight distribution determination of clinical dextran by gel permeation chromatography. *Ibid* 1974; 101: 137.
9. Shirlex CC. Gel chromatography of carbohydrates. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1970; 25: 13.

## DETERMINATION OF PURITY AND MOLECULAR WEIGHT OF POLYSACCHARIDES BY HIGH PERFORMANCE GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY

YA Wei and JN Fang

(Shanghai Institute of Materia Medica, Academia Sinica, Shanghai 200031)

**ABSTRACT** Polysaccharides, PIB-I, PIB-II-A, PIB-II-B and PIA-I, were prepared in our laboratory. Their purity and molecular weight ( $\bar{M}_w$ ) were determined by high performance gel permeation chromatography (HPGPC). The HPGPC system consisted of a two-column set, Bio-Gel TSK-50 and TSK-40 columns. 0.2 mol/L phosphate pH 6.0 buffer and 0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.0 buffer were used as mobile phase, respectively. The void volume and total volume were measured using dextran T-2000 and glucose. The  $\bar{M}_w$  of samples were determined from the standard curves which were made by standard dextran T-series. In two different mobile phases, the deviations

of Mw were less than 6.0% , which showed that the method is highly sensitive, accurate, reproducible and rapid.

**Key words** High performance gel permeation chromatography; Polysaccharides; Molecular weight

## 更 正

本刊第 24 卷第 6 期第 472 页文题“去氢紫堇碱对兔血小板 TXB<sub>2</sub> 及主动脉 6-keto-PGF<sub>1α</sub>PGF<sub>1α</sub> 含量的影响”应改为“去氢紫堇碱对兔血小板 TXB<sub>2</sub> 及主动脉 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 含量的影响”。